Estudio *in vitro* de la capacidad depredadora de *Duddingtonia flagrans* contra larvas de nematodos gastrointestinales de ovinos de pelo

In vitro predacious ability of *Duddingtonia flagrans* against gastrointestinal nematode larvae of hair sheep

Roberto González Garduño[a], Pedro Mendoza de Gives[b], Glafiro Torres Hernández[c], Carlos Becerril Pérez[c], Eusebio Ortega Jiménez[d], Omar Hernández Mendo[c]

RESUMEN

El control biológico de nematodos con hongos es una alternativa para evitar la resistencia antihelmíntica. El objetivo de la presente investigación fue conocer la capacidad depredadora de *Duddingtonia flagrans* contra cultivos de *Haemonchus* y *Cooperia,* al estimar el porcentaje de reducción de poblaciones de nematodos en diferentes medios de cultivo. El experimento se llevó a cabo en la Universidad Autónoma Chapingo en Teapa, Tabasco, México. Se utilizó una cepa mexicana de *D. flagrans* que se sometió a dos pruebas; en la primera se contaron directamente larvas atrapadas, libres, enroscadas y muertas. En la segunda se desafió el hongo con nematodos en tres diferentes medios: agua-agar (AA), harina de maíz-agar (HMA) y papa-dextrosa-agar (PDA) a tres tiempos de recuperación (24, 48 y 96 h). En la primera prueba se observaron anillos y redes, así como larvas atrapadas en esas estructuras. El porcentaje de larvas atrapadas fue mayor a las 48 h (68.4 ± 16.0) respecto a las 24 h (41.1 ± 19.9; *P*<0.01). En la segunda prueba el porcentaje de reducción en PDA (26.0 %) y HMA (48.7 %) fue menor que en AA (75.9 %) y no hubo diferencia en el tiempo de recuperación ni en la interacción con el medio de cultivo. El porcentaje de larvas de *Haemonchus* (84.98 ± 16.9 %) y el de *Cooperia* (14.5 ± 16.4 %) fue similar en todos los factores estudiados. Es importante considerar el tipo de medio de cultivo en el que se realizan las pruebas *in vitro*, ya que la concentración de nutrimentos puede afectar la capacidad nematófaga del hongo.

PALABRAS CLAVE: *Duddingtonia flagrans*, Control biológico, Nematodos gastrointestinales, Reducción larvaria.

ABSTRACT

The nematode control using fungi is one alternative to prevent anthelmintic resistance. The purpose of this study was to evaluate the *in vitro* predacious ability of *Duddingtonia flagrans* against *Haemonchus* and *Cooperia* infective larvae, by both visualizing and measuring the larvae trapping activity (LTA) and by the nematode populations reduction in different culture media. These experiments were carried out at the Autonomous University of Chapingo in Teapa, Tabasco, Mexico. One *D. flagrans* Mexican strain was used in the two trials. In the first trial, LTA was visualized and measured under the microscope and observations were described. In the second trial, a reduction of the nematode population by the fungal activity was evaluated using three different culture media: water agar (WA), corn meal agar (CMA), and dextrose potato agar (DPA) at 3 different recovery times (24, 48, and 96 h). In the first trial, both rings and adhesive loops were observed, as well as larvae trapped in such structures. The LTA was higher at 48 h (68.4 ± 16.0 %) as compared to that found at 24 h (41.1 ± 19.9 %; *P*<0.01). In the second trial, the reduction percentage in DPA was 26.0 % and 48.7% in CMA, which was lower than that in WA (75.9 %), and differences were observed in the recovery times and/or in the interaction with the culture medium. The percentage of *Haemonchus* (84.98 ± 16.9 %) and *Cooperia* (14.5 ± 16.4 %) remained equal in all aspects studied.

KEY WORDS: *Duddingtonia flagrans*, Biological control, Gastrointestinal nematodes, Larval reduction.

Recibido el 23 de febrero de 2004 y aceptado para su publicación el 13 de mayo de 2005.

a Universidad Autónoma de Chapingo, Centro Regional Universitario del Sureste, Km 7.5 Carretera Teapa-Vicente Guerrero. Apartado Postal No. 29, Teapa, Tab. 86800. Tel: 01 (932) 3271622, Fax: 01 (932) 3220615 e-mail: robgardu@hotmail.com, rglezg@colpos.mx. Correspondencia al primer autor.

b CENID-PAVET INIFAP.

c Programa de Ganadería, IREGEP. Colegio de Postgraduados.

d Campus Veracruz. Colegio de Postgraduados.

Proyecto Financiado por la Fundación Produce Tabasco, A. C.

En México, los nematodos gastrointestinales son responsables de la disminución en la producción de bovinos, ovinos y caprinos en pastoreo, en especial en los climas cálidos, donde las condiciones ambientales favorecen su proliferación[1]. Su control se ha realizado tradicionalmente con productos farmacéuticos[2], y el uso frecuente de estos ha originado resistencia antihelmíntica en muchos países y en todas las familias de desparasitantes usados[3,4], por lo que se han propuesto otros métodos de control, de los cuales el uso de agentes biológicos ha sido muy estudiado[5,6], en especial los hongos nematófagos, que ayudan a reducir el número de larvas infestantes de las pasturas y prevenir futuras infestaciones en los rebaños que muestran resistencia antihelmíntica[7].

Duddingtonia flagrans es un hongo depredador que desarrolla estructuras especializadas (anillos y redes adhesivas), con las cuales captura e inmoviliza a los nematodos, penetra el cuerpo y finalmente consume el contenido[8]. Los estudios *in vitro* con esta especie han probado que se logra una reducción del número de larvas de los estadios de vida libre de los nematodos parásitos[7,8]. Sin embargo, existen pocos estudios *in vitro* con cultivos mixtos, sin duda frecuentemente observados en animales en pastoreo, y por otra parte, debido a que este hongo es saprofito[9], y también capaz de cambiar su alimentación dependiendo del tipo de sustrato en el cual se encuentre, lo cual puede modificar su capacidad nematófaga, por lo que se propuso como objetivo de esta investigación conocer la capacidad depredadora de *D. flagrans* contra cultivos mixtos de *Haemonchus* y *Cooperia,* al estimar el porcentaje de reducción en diferentes medios de cultivo.

El experimento se realizó en el Centro Regional Universitario del Sureste (CRUSE) de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), ubicado en Teapa, Tabasco. El clima de la región es cálido húmedo con lluvias todo el año. La temperatura media anual es 25.8 ºC y la precipitación de 3,976 mm Af(m)wi'g[10].

Se utilizó una cepa de *D. flagrans* (FTHO-8) proporcionada por el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET), del INIFAP en Cuernavaca, Morelos, aislada de heces de ovino[11,12].

La actividad nematófaga de *D. flagrans* se comprobó en dos pruebas, la primera se realizó en tres ocasiones

In Mexico, gastrointestinal (GI) nematodes are responsible for production losses in grazing cattle, sheep, and goats, particularly in hot weather, where environmental conditions promote parasite proliferation[1]. GI nematode control has been traditionally based on the use of drugs[2]. The frequent use of drugs has resulted in resistance to anthelmintics in many countries, affecting all antiparasitic drug classes used[3,4]. Therefore, other control methods have been proposed. The use of biological agents as nematode control methods has been widely studied[5,6], particularly nematophagous molds that help in decreasing the numbers of infecting larvae (L_3) from pasture, as well as preventing future infections in herds with anthelmintic resistance[7].

Duddingtonia flagrans is a predacious mold that develops specialized structures (rings and y adhesive loops), used to catch and immobilize nematodes. The mold then penetrates nematode's body, to lastly consume its content[8]. *In vitro* studies with this mold species have shown that it reduces the number of free-living larval stages of parasitic nematodes[7,8]. Nevertheless, only a few *in vitro* studies have been carried out with mixed cultures. Mixed nematode infections unquestionably occur in grazing livestock. On the other hand, *D. flagrans* is a saprophytic mold[9] and it has the ability of altering both its feeding habits in accordance with the substrate and its nematophagous ability. Therefore, the objective of this research was to know the predacious ability of *D. flagrans* against mixed *Haemonchus/Cooperia* cultures by estimating percent reductions in different culture media.

This experiment was carried out at the Autonomous University of Chapingo's South East Regional Center (UACH's CRUSE), located in Teapa, Tabasco, Mexico. Weather in the region is hot and humid, with rains year round. Mean annual temperature is 25.8 ºC, and raining rate is 3,976 mm Af(m)wi'g[10].

D. flagrans FTHO-8 strain was used. This strain was isolated from sheep feces[11,12] and provided by the National Center of Disciplinary Research in Veterinary Parasitology (*CENID-PAVET*), Mexico's National Institute for Forestry, Agricultural and Animal Research (*INIFAP*) Jiutepec, Morelos.

The nematophagous ability of *D. flagrans* was proven using two tests. The first test was performed on 3 d

durante el mes de octubre del 2002 (días 12, 17 y 21) y consistió en observar directamente al hongo y los nematodos. En la segunda prueba se estimó de manera indirecta (con la recuperación de larvas) la acción del hongo, y se realizó en agosto del 2003 (días 4, 6 y 10).

Para cada prueba se utilizaron cultivos mixtos de larvas de nematodos gastrointestinales obtenidos de animales en pastoreo con infestación natural, por lo que las proporciones de cada género fueron diferentes en las dos pruebas en que se realizó el estudio. Los géneros incluyeron *Haemonchus contortus* y *Cooperia punctata* (98 y 2 % en la primera prueba; 8 y 16 %, en la segunda prueba, respectivamente). Las larvas se obtuvieron del cultivo de heces por el procedimiento de Corticelli Lai[13] y se concentraron en el aparato de Baermann[14] para su posterior identificación con base en características morfométricas[13] a partir del conteo de 200 larvas. Los cultivos se realizaron 15 días antes de utilizarse, y una vez obtenidas las larvas, se limpiaron en una solución de sacarosa al 50 % y se enjuagaron en agua estéril con bencil-penicilina y estreptomicina en concentraciones de 200 UI y 260 mg ml^{-1}, respectivamente[1].

En la primera prueba se establecieron dos series de 10 cajas Petri (9 cm de diámetro), con HMA como medio de cultivo para determinar el porcentaje de captura del hongo por medio de observación directa, para determinar el porcentaje de larvas atrapadas; por lo cual sólo se agregaron en las cajas Petri entre 60 a 100 larvas de nematodos contadas de manera individual, debido a que se trataría de localizar la mayor cantidad de ellas y este número era factible de contar. A los cuatro días después de la siembra del hongo se agregaron las larvas y se incubó a temperatura ambiente (mínima 21 ºC, máxima 30 ºC, media 23.5 ºC). Se revisaron las larvas de manera individual en todas las cajas a las 24 y 48 h y por medio de un microscopio óptico a 10 y 40X se contaron las larvas atrapadas (en anillos o redes tridimensionales), libres, enroscadas y muertas. El porcentaje de larvas atrapadas respecto al total de larvas contabilizadas se calculó mediante la siguiente fórmula[1,12,15], la cual se modificó al integrar las categorías de los diferentes estados de las larvas que representaron el total de larvas:

$$A = \frac{x}{x+y+w+z} * 100$$

(October 2, 17, and 21, 2002) by direct observation of the interaction of both population mold and nematodes. In the second test, mold action was indirectly measured (by larval recovery) on August 4, 6, and 10, 2003.

In each test mixed cultures of GI nematode larvae from grazing, naturally infected animals were used, so that the proportion of each nematode species varied in the two tests. Species included *Haemonchus contortus* and *Cooperia* spp. (98 % and 2 % in the first test; 8 % and 16 %, in the second test, respectively). Larvae were obtained from fecal cultures using Corticelli Lai's procedure[13]. Larvae were concentrated using the Baermann's apparatus[14]. Larvae where then identified on the basis of their morphometric characteristics[13] using 200 larvae. Cultures were performed 15 d prior to use. Once obtained, larvae were cleaned using a 50% saccharose solution, then rinsed in sterile water with benzyl penicillin and streptomycin (200 IU and 260 mg ml^{-1}, respectively[1].

Two 10 Petri dish (diameter: 9 cm) series were established in the first test, using CMA medium to determine mold's percent catching ability by direct observation, in order to determine the percentage of trapped larvae. Only 60 to 100 individually counted larvae were added to the plate, since this reduced amount of larvae allows for the determination of most of them. Four days after mold seeding, larvae were added, then incubated at ambient temperature (minimun 21 ºC, maximum 30 ºC, mean 23.5 ºC). Twenty four (24) and 48 h later, larvae in all plates were individually observed. Using an optic microscope (10 and 40X) trapped (in either rings or adhesive loops), free, curled, and dead larvae, were counted. The trapping larvae percentage was estimated using the equation below[1,12,15]. The equation was modified when the different larval categories within total larval count were integrated.

$$A = \frac{x}{x+y+w+z} * 100$$

Where: A = % catch, x = number of trapped larvae, y = number of free larvae, w = number of curled larvae, z = number of dead larvae.

The number of trapped larvae was estimated. The trapped larvae + curled larvae variable was also

Donde: A = porcentaje de captura, x = número de larvas atrapadas, y = número de larvas libres, w = número de larvas enroscadas, z = número de larvas muertas.

Se calculó el porcentaje de larvas atrapadas y también se calculó la variable larvas atrapadas + enroscadas, la cual se generó debido a que se observaron muchas larvas enroscadas sin movimiento, que se encontraban rodeadas por hifas y algunas veces cerca de anillos de *D. flagrans*.

El porcentaje de larvas atrapadas y el porcentaje de larvas enroscadas + las atrapadas se transformaron a log n (porcentaje de larvas), con el fin de reducir el coeficiente de variación, y posteriormente se sometieron a un análisis de varianza[16], con el procedimiento GLM del SAS[17].

Se utilizó un diseño en bloques al azar, donde cada ocasión en que se realizó la prueba representó un bloque, ya que cada uno se trabajó de manera homogénea pero en distinta fecha, por lo que el modelo quedó de la siguiente manera:

$$Y_{ijk} = m + t_i + b_j + e_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = variable respuesta (porcentaje de larvas atrapadas, porcentaje de larvas atrapadas y enroscadas); m = Media poblacional; t_i = efecto del i-ésimo tratamiento (i=Sin hongo, atrapamiento a las 24 h, atrapamiento a las 48 h); b_j = efecto del j-ésimo bloque (j= I, II, III); $e_{ijk} \sim$ IIN $(0, s^2)$.

Las medias se compararon con la prueba de Tukey al 95 % de confianza[16].

En esta prueba se pudieron distinguir cuatro categorías de larvas: a) libres, aquéllas que se desplazaban por la caja continuamente; b) enrolladas, las que se encontraban de esa forma e inmóviles y en algunos de los casos rodeadas por hifas; c) atrapadas, aquéllas que fijas o en movimiento estaban en contacto con anillos o redes adhesivas tridimensionales; d) muertas, aquéllas que permanecían rígidas y en posición recta sin contacto con redes o anillos (Cuadro 1).

En muchas de las cajas se observaron anillos y redes adhesivas tridimensionales en las hifas, en las cuales también se notó abundancia de clamidosporas. En

estimated. This combination parameter was generated since many curled, immobile larvae surrounded by hyphae and sometimes nearby *D. flagrans* rings were observed.

Percent trapped larvae and porcentage curled larvae + trapped larvae were transformed to log n (% larvae), in order to decrease the coefficient of variation, then subjected to a variance analysis[16], using SAS' GLM procedure[17].

A random block design was used. One block was represented each time the test was performed, since each test was run homogeneously but on a different date. Therefore, the model was as follows:

$$Y_{ijk} = m + t_i + b_j + e_{ijk}$$

Where:

Y_{ijk} = response variable (% trapped larvae, % trapped + curled larvae); m = population mean; t_i = effect of i-th treatment (i = no mold, trapped at 24 h, trapped at 48 h); b_j = effect of the j-th block (j= I, II, III); $e_{ijk} \sim$ IIN $(0, s^2)$.

Means were compared using Tukey's test with a 95 % confidence[16].

Four different larval categories were distinguished in this test: a) free larvae – those moving continuously throughout the plate; b) curled larvae – coiled, immobile, sometimes hypha surrounded larvae; c) trapped larvae – fixed or moving larvae in contact with rings or tri-dimensional adhesive loops; d) dead larvae – rigid, straight larvae with no loop/ring contact (Table 1).

Many plates contained rings and tri-dimensional adhesive loops in the hyphae, with abundant chlamydospores. In another study this effect has been also observed since this mold produces a great amount of chlamydospores, and it can be easily reproduced under laboratory conditions[12,18].

Twenty four (24) hours after adding the larvae to the culture medium containing *D. flagrans,* some nematodes were observed into the rings, which in the beginning had vigorous movement. Later (48 h), larvae were immobile and trapped in 3 to 5 ring loops. The percentage of trapped larvae on the 48 h reading was higher ($P<0.01$) than that at 24 h (68.4 ± 16.0, and 41.1 ± 19.9, respectively). This situation was similar

otros estudios también se ha observado este efecto, ya que este hongo produce una gran cantidad de esporas y se puede reproducir fácilmente en condiciones de laboratorio[12,18].

A las 24 h después de agregar las larvas al medio de cultivo con *D. flagrans* se observaron algunos nematodos en los anillos; al principio tenían movimientos vigorosos, y posteriormente (48 h) aparecían inmóviles y atrapados en redes con tres a cinco anillos. El porcentaje de larvas atrapadas fue mayor en la lectura realizada a las 48 h ($P<0.01$) respecto a las 24 h (68.4 ± 16.0 y 41.1 ± 19.9, respectivamente), situación similar a la variable larvas atrapadas + enroscadas (76.4 ± 2.4 y 91.3 ± 1.6 % a las 24 y 48 h). Los valores de larvas atrapadas encontrados fueron menores a los indicados en un estudio con *D. flagrans* contra *Panagrellus redivivus*, en el cual el mayor comportamiento depredador puede atribuirse al tiempo de exposición, ya que en este estudio la observación se realizó hasta las 48 h y en el estudio de referencia el alto porcentaje de captura se registró hasta los cinco días[12]. En otro estudio se encontraron resultados similares al presente, con valores de captura de alrededor del 55 % de larvas de *Haemonchus* y 40 % de larvas desenvainadas del

to the trapped larvae + curled larvae variable (76.4 ± 2.4, and 91.3 ± 1.6 % at 24 and 48 h). Trapped larva values were lower than those obtained in a study with *D. flagrans* against *Panagrellus redivivus*, where the higher predacious behavior can be attributed to exposure time, since in our study the observation was performed at 48 h while in the study of reference the high trapping percentage was recorded on d 5[12]. Other study yielded resulted similar to ours, with capture values ~55% *Haemonchus* larvae, and 40% *Haemonchus* naked, sheath-less larvae, 24 h after culture initiation[1]. *D. flagrans* has also shown predatory activity against other nematode species such as *Caenorhabditis elegans*, in which case 82.8 % catch was obtained at 24 h, 93.2 % at 48 h, and 95 % at 60 h[19].

In the second test water agar (WA), corn meal agar (CMA), and dextrose potato agar (DPA) media were used in two 10 - 15 Petri dish series, in order to investigate the influence of the culture medium and the recovery time of the mold capture percentage. In all assays, series I was seeded with *D. flagrans*, while in series II culture media were maintained mold free as a control. Reduction of GI nematode numbers was indirectly evaluated by looking at larval recovery

Cuadro 1. Porcentaje de larvas de nematodos gastrointestinales encontradas en cajas Petri con harina de maíz-agar solo (testigo) y en harina de maíz-agar y *Duddingtonia flagrans*, a las 24 y 48 h después de agregadas

Table 1. Gastrointestinal nematode larvae percentages observed on corn meal agar plates (control) and corn meal agar + *Duddingtonia flagrans* plates at 24 and 48 h after larvae addition

	N	Free larvae Number (%)	Curled larvae Number (%)	Trapped larvae Number (%)	Dead larvae Number (%)	Total larvae
Replication I (October 12)						
Control	10	9.9 (90.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)^{a}	1.1 (10.0)	11.0
24 h reading	10	7.8 (27.0)	3.8 (13.1)	16.7 (57.8)^{b}	0.6 (2.1)	28.9
48 h reading	10	2.0 (6.7)	5.2 (17.4)	22.1 (74.2)^{c}	0.5 (1.7)	29.8
Replication II (October 17)						
Control	10	9.0 (95.7)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)^{a}	0.4 (4.3)	9.4
24 h reading	10	10.9 (17.6)	23.0 (37.0)	26.9 (43.3)^{b}	1.3 (2.1)	62.1
48 h reading	10	2.8 (5.4)	12.9 (24.7)	35.9 (68.6)^{c}	0.7 (1.3)	52.3
Repetición III (21 de octubre)						
Control	10	16.6 (90.7)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)^{a}	1.7 (9.3)	18.3
24 h reading	10	11.4 (16.9)	33.0 (48.9)	21.5 (31.9)^{b}	1.6 (2.4)	67.5
48 h reading	10	3.8 (7.1)	13.9 (26.1)	35.1 (65.9)^{c}	0.5 (0.9)	53.3

N: Number of plates.

^{abc} Different superscripts in each column mean differences ($P<0.05$).

mismo género, a las 24 h de iniciado el cultivo[1]. La actividad depredadora de *D. flagrans* también se ha observado contra otras especies de nematodos como *Caenorhabditis elegans*, con el cual se obtuvo un porcentaje de captura de 82.8 % a las 24 h, 93.2 % a las 48 h y a las 60 h alcanzó más del 95 % de captura[19].

En la segunda prueba se utilizaron agua-agar (AA), harina de maíz-agar (HMA) y papa-dextrosa-agar (PDA) como medios de cultivo en dos series de 10 a 15 cajas, con el fin de conocer la influencia del medio de cultivo y el tiempo de recuperación en el porcentaje de captura del hongo. En todos los ensayos la serie I se sembró con *D. flagrans*, mientras que la serie II sólo se mantuvo con el medio de cultivo y fungió como testigo. La reducción del número de nematodos gastrointestinales se realizó de manera indirecta al evaluar la recuperación de larvas después de la acción nematófaga del hongo. Para esto, al cuarto día de la siembra de *D. flagrans* se agregaron en promedio 1,073 larvas para favorecer la actividad nematófaga, mientras que en la serie del medio de cultivo se agregó la misma cantidad para conocer la recuperación de larvas del grupo testigo. Las larvas fueron contabilizadas en alícuotas de 250 ml, y posteriormente se agregaron en un volumen conocido en el centro de las cajas Petri, para después incubar a temperatura ambiente (mínima 30.7 ºC, máxima 36.6 ºC, media 33.6 ºC). La recuperación larvaria fue a las 24, 48 y 96 h por el método de Baermann[14]. Esta consistió en enjuagar la superficie del agar con agua destilada, se desprendió y se colocó en un embudo con suficiente agua. Se dejó el aparato de Baermann durante la noche (12 h) y a la mañana siguiente se recogieron las larvas en tubos de ensayo de 7.5 ml, los cuales se dejaron reposar a 4 ºC por 6 h. Después se eliminó el sobrenadante hasta ajustar el volumen a 2.5 ml, y se tomó una alícuota de 250 ml en la que se contó el número de larvas en un microscopio compuesto a 4 y 10X. De esta manera el porcentaje de reducción del número de larvas respecto al testigo se obtuvo con la fórmula (100 – M).

$$M = \left(\frac{Rt}{Rc}\right) * 100$$

Donde:

M : Porcentaje de recuperación de larvas respecto al testigo; Rt: Porcentaje de recuperación de larvas de las cajas conteniendo *Duddingtonia flagrans* = (larvas

after fungus-nematode action. For this purpose, an average of 1,073 larvae were added four days after mold seeding, in order to promote the nematophagous activity. The same amount of larvae was added to the mold-free culture media in order to determine larval recovery in the controls. Larvae were counted in 250 ml aliquots. Larvae were then added to the center of each plate in a known volume, and incubated at ambient temperature (minimum 30.7 ºC, maximum 36.6 ºC, mean 33.6 ºC). Larval recovery was performed at 24, 48, and 96 h using Baermann's method[14]. For this purpose, agar surface was rinsed with distilled water, then detached and placed in a funnel with water. Preparations were left in Baermann's apparatus overnight (12 h). Larvae were collected the following morning in a 7.5 ml test tube, and then set aside at 4 ºC for 6 h. Supernatant was then discarded until volume was adjusted to 2.5 ml. A 250 ml aliquot was obtained in order to count the number of larvae using a light microscope (4 and 10X). Percent larval reduction over the control was estimated using the (100 – M) equation:

$$M = \left(\frac{Rt}{Rc}\right) * 100$$

Where:

M: % larval recovery as compared to control; Rt: % larval recovery from plates containing *D. flagrans* = (larvae recovered from treatment / larvae added to treatment) *100; Rc: % recovery of larvae from plates using culture medium as a control (recovered larvae / added larvae) *100.

Nematode genus was determined using an average of eight larvae from each plate. This represented a total of 40 larvae/culture medium at different larvae recovery times, using the morphological codes described by Niec[13].

Reduction larval percent was subjected to the analysis of variance[16] using the SAS software[17] in a random block model with a factorial arrangement and 95% confidence.

$$Y_{ijkl} = m + b_i + t_j + d_k + t_j * d_k + e_{ijkl}$$

Where:

Y_{ijkl} = response variable (% reduction in larval numbers, % nematode genera); m = population mean;

recuperadas del tratamiento / larvas agregadas al tratamiento) *100; Rc: Porcentaje de recuperación de larvas de las cajas con el medio de cultivo como testigo (larvas recuperadas / larvas agregadas) *100.

El género de los nematodos se determinó en un promedio de ocho larvas por cada caja Petri; esto fue un total de 40 larvas por cada grupo en cada medio de cultivo a las diferentes horas de recuperación larvaria, que se identificaron utilizando las claves morfológicas descritas por Niec[13].

El porcentaje de reducción del número de larvas se sometió a un análisis de varianza[16] mediante el paquete SAS[17] en un modelo de bloques al azar con arreglo factorial a un 95% de confianza.

$$Y_{ijkl} = m + b_i + t_j + d_k + t_j{*}d_k + e_{ijkl}$$

Donde:

Y_{ijkl} = variable respuesta (Porcentaje de reducción del número de larvas, porcentaje de géneros de nematodos); m = Media poblacional; b_i = efecto del i-ésimo bloque (i= I, II, III); t_j = efecto del j-ésimo medio de cultivo (i= AA con hongo, AA sin hongo, HMA con hongo, HMA sin hongo, PDA con hongo, PDA sin hongo); d_k = efecto de la k-ésima hora de recuperación de larvas (k=24, 48, 96); $t_j{*}d_k$ = efecto conjunto del j-ésimo medio de cultivo y la k-ésima hora de recuperación de larvas; e_{ijkl} ~ IIN (0, s^2).

Las medias se compararon con la prueba de Tukey al 95% de confianza[16].

En esta prueba se encontraron diferencias entre medios de cultivo ($P<0.01$) en la variable porcentaje de reducción del número de larvas ajustado al testigo, mientras que entre horas y en la interacción de hora de recuperación y medios de cultivo los valores fueron similares ($P>0.05$).

Tal como se esperaba, en cada una de las fechas en que se realizó el ensayo (bloques), los valores encontrados en la reducción de la población larvaria fueron diferentes ($P<0.01$), debido probablemente a factores ambientales y al manejo del material, y como se ha encontrado en otro estudio[20], la temperatura pudo afectar el crecimiento y comportamiento depredador de los hongos. En *Arthrobotrys conoides y A. oligospora* se ha observado el efecto de la

b_i = effect of the i-th block (i= I, II, III); t_j = effect of j-th culture medium (i = WA with mold, WA with no mold, CMA with mold, CMA with no mold, DPA with mold, DPA with no mold); d_k = effect of the k-th larval recovery hour (k=24, 48, 96); $t_j{*}d_k$ = jointly effect of j-th culture medium + k-th larval recovery time; e_{ijkl} ~ IIN (0, s^2).

Means were compared using Tukey's test at 95% confidence[16].

In this test, differences ($P<0.01$) among culture media were found regarding the control-adjusted larval number reduction percent, while among hours, and recovery hour x culture medium interaction values, were similar ($P>0.05$).

As expected, in one of the days (blocks) in which the assay was performed, larval population decreasing values differed ($P<0.01$), probably due to environmental factors and material management differences and, as observed in another study[20] temperature could have affected mold growth and predacious behavior. Temperature has also affected the effect of *Arthrobotrys conoides and A. oligospora* against *Haemonchus contortus,* with 90.4 % and 25.7 % catch ability respectively at 25 °C, but no rings or larvae trapping occurred at 30 ºC[15]. This can also have affected the values found in this study.

Culture media also affected the trapping activity which was reflected as a decreasing in the number of recovered larvae, since non recovered larvae were assumed to have been trapped by the mold. When nutrient-rich media (DPA and CMA) were used, percentage larval population reduction was higher than that in WA. This performance was clearly observed in plates with *D. flagrans,* both in control-adjusted and non adjusted percentage larval number reduction (Table 2), possibly because this is a facultative saprophytic mold. This way, when the substrate contains limited amounts of nutrients, nematodes become an important nitrogen source during mold's growth phase[9], thus enhancing its predacious behavior. As shown elsewhere, mycelium development was very abundant on DPA and CMA, as apposite to WA, where such growth was reduced[9]. Mycelium development is not related with nematophagous activity, since the passage from the saprophytic phase to the

Cuadro 2. Porcentaje de reducción del número de larvas y de larvas ajustadas al testigo en diferentes medios de cultivo con y sin *Duddingtonia flagrans*

Table 2. Reduction percentage in number of larvae and control-adjusted larvae in different culture media with and without *Duddingtonia flagrans*

			Not adjusted		Control-adjusted (%)	
Culture media	Group	N	Reduction* (%)	Standard error	Reduction* (%)	Standard error
Water agar	With mold	40	87.9[a]	2.1	75.9[a]	3.9
	No mold	38	46.9[d]	3.7	0.0[d]	0.0
Corn meal	With mold	40	89.9[a]	1.4	48.7[b]	5.3
	No mold	40	82.1[c]	1.9	0.0[d]	0.0
Potato-dextrose	With mold	40	74.1[b]	1.9	26.0[c]	4.8
	No mold	40	68.2[bc]	2.2	0.0[d]	0.0

abcd Different superscripts in each column mean differences (P<0.01).

N=Number of plates.

* Reduction in GI nematode larvae (100 – larvae recovered).

temperatura al usarlos contra *Haemonchus contortus,* ya que a 25 ºC se ha observado un porcentaje de captura de 90.4 y 25.7 % en estas especies respectivamente, pero no se observaron ni anillos ni captura de larvas a 30 ºC[15], lo cual posiblemente influyó en los valores que se encontraron en este estudio.

El medio de cultivo utilizado afectó la recuperación de larvas y por deducción el porcentaje de reducción del número de las mismas, ya que se considera que las larvas no recuperadas fueron atrapadas por el hongo. En los medios ricos en nutrientes (PDA y HMA) el porcentaje de reducción de la población larvaria fue menor que en el medio de cultivo de AA. Este comportamiento se observó claramente en las cajas Petri con *D. flagrans,* tanto en el porcentaje de reducción del número de larvas ajustado al testigo como en el no ajustado (Cuadro 2), posiblemente porque este hongo es saprofito facultativo, y cuando el medio de cultivo posee cantidades limitadas de nutrimentos, los nematodos son una fuente importante de nitrógeno durante el crecimiento[9], lo cual favorece su comportamiento depredador.

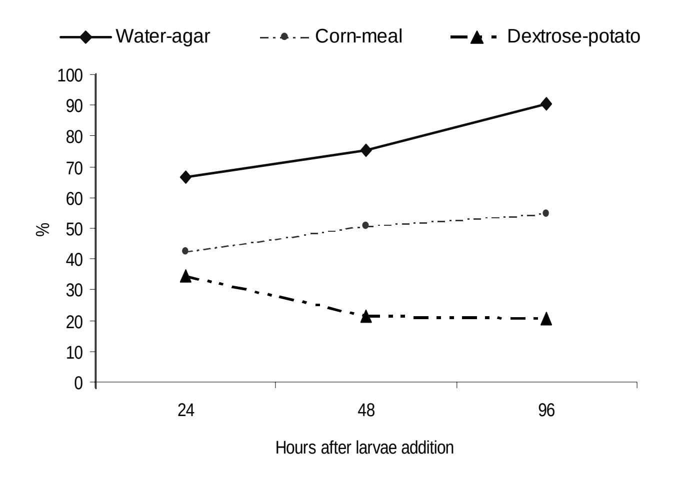
El crecimiento del micelio fue muy abundante en los medios de cultivo de PDA y HMA, mientras que en AA fue reducido, y tal como se ha indicado en otro estudio[9], el desarrollo del micelio no está relacionado con la actividad nematófaga, dado que el cambio de la fase saprofita a la parásita depende de la influencia de factores bióticos y abióticos[21]. En este estudio se

parasitic phase depends on the influence of both biotic and non-biotic factors[21]. This study showed a lower porcentage larval number reduction when mycelium growth was abundant (CMA and DPA).

Both larval recovery time and larval recovery time x culture media interaction showed no statistical differences. This means that percentage trapping depended only on culture media. Trapping percent values were similar at 24, 48, and 96 h (Figure 1).

Figura 1. Porcentaje de reducción del número de larvas a distintos tiempos y en diferentes medios de cultivo

Figure 1. Reduction percentage in larval numbers at different times, on different culture media



observó que el menor porcentaje de reducción del número de larvas de nematodos ocurrió cuando el crecimiento del micelio fue abundante (HMA y PDA).

El tiempo al cual se recuperaron las larvas no mostró diferencias estadísticas ni su interacción con los medios de cultivo. Esto indica que los porcentajes de captura sólo dependieron de los medios de cultivo y fueron similares tanto a las 24, 48 como a las 96 h (Figura 1). Estos resultados fueron diferentes a lo encontrado en un estudio con *D. flagrans* (FTHO-8) que indica un incremento en la actividad predatoria conforme transcurre el tiempo, obteniéndose porcentajes de 22.7 % a las 12 h, 82.4 % a las 24 h y hasta 97.4 % a las 60 h en *Caenorhabditis elegans* tipo silvestre[19].

Con relación a los géneros de nematodos adicionados a las cajas Petri, no se encontraron diferencias en ninguno de los factores estudiados (medios de cultivo y tiempo de recuperación de larvas). El promedio general fue de 84 % para *Haemonchus* y 16 % para *Cooperia*, valores muy parecidos a los recuperados en todos los medios de cultivo y a los diferentes tiempos (de 80 a 91 % para *Haemonchus* y de 8.3 a 19 % para *Cooperia*). En los tratamientos con el hongo se encontraron porcentajes de *Haemonchus* y *Cooperia* (85.6 % y 13.4 %) similares a los de las cajas Petri que constituían el testigo (84.3 y 15.4 %), en la identificación de 908 y 886 larvas, respectivamente. Esto podría indicar que la reducción de la población larvaria ocurrió tanto en *Haemonchus* como en *Cooperia*, ya que el grupo sin hongo mantuvo el mismo porcentaje de especies que el grupo con *D. flagrans*. Sin embargo, existe un estudio con *D. flagrans* en el que se encontró diferencia en la capacidad depredadora dependiendo de la especie, así cuando se probó contra *T. circumcincta* y *Trichostrongylus axei*, en este último se observó un bajo porcentaje de captura[19].

Los estudios *in vitro* con hongos nematófagos se han realizado contra distintas especies de nematodos parásitos de plantas[19] y de animales, utilizando varias especies de hongos[22]. De las especies con interés veterinario se ha usado *Arthrobotrys robusta* contra *Haemonchus contortus* con un alto porcentaje de captura a los siete días de interacción[1]. Existen otros estudios en los que se ha observado el comportamiento depredador de *D. flagrans* contra *Ostertagia ostertagi*[23] y se ha notado la reducción del número

These results differed from those in one study with *D. flagrans* (FTHO-8) that showed increased predacious activity as time progressed (22.7 % at 12 h; 82.4 % at 24 h; and up to 97.4 % at 60 h) against wild type *Caenorhabditis elegans*[19].

Regarding the genera of nematodes added to the plates, no differences were found in any of the studied parameters (culture medium and larval recovery time). The general average was 84 % for *Haemonchus* and 16% for *Cooperia*. These values are very similar in all media at all times (80 to 91 % for *Haemonchus;* 8.3 to 19 % for *Cooperia*). Mold-treated plates showed values for both *Haemonchus* and *Cooperia* (85.6 and 13.4 %) similar to those in control plates (84.3 and 15.4 %), when 908 and 886 larvae were identified, respectively. This could mean that larval population reduction occurred in both *Haemonchus* and *Cooperia*, since the mold-free group maintained the same percentage species as the *D. flagrans* group. Nevertheless, another study[19] found species-related differences in the predacious ability of *D. flagrans*, with a higher value against *T. circumcincta* and a lower trapping percent against *Trichostrongylus axei*.

In vitro studies have also been performed with different nematophagous mold species against different parasitic nematodes of plants[19] and animals[22]. As far as nematode species of veterinary interest are concerned, *Arthrobotrys robusta* has been used against *Haemonchus contortus* with a high percent of trapping ability after 7 d of interaction[1]. In other studies, the predacious performance of *D. flagrans* against *Ostertagia ostertagi*[23] has been observed. Reduction in *Ostertagia, Trichostrongylus*[24] and *Nematodirus*[25] larval numbers in fecal cultures have been reported.

In *in vitro* studies it is important to consider the culture medium when analyzing the predatory ability of *D. flagrans*, since from our results it can be concluded that nutrient concentrations in the media can affect mold's trapping ability. Studies should be performed, in order to learn about the predacious performance of molds against mixed nematode field infections, since literature reports on this regard are limited.

ACKNOWLEDGEMENTS

Our thanks are expressed to Foundation Produce

de larvas de *Ostertagia, Trichostrongylus*[24] y *Nematodirus* [25] en cultivos de heces.

En los estudios *in vitro* es importante considerar el tipo de medio de cultivo cuando se realizan pruebas de la capacidad depredadora de *D. Flagrans*, ya que por los resultados obtenidos se puede concluir que la concentración de nutrimentos del medio puede afectar la capacidad nematófaga del hongo. También es recomendable realizar estudios con infecciones mixtas, lo cual permitirá conocer el comportamiento depredador de los hongos en infecciones de campo, ya que la literatura disponible al respecto es limitada.

AGRADECIMIENTOS

A la fundación Produce Tabasco A. C. y a la Dirección de Centros Regionales de la Universidad Autónoma Chapingo por el financiamiento otorgado. Al C. Cornelio Hernández García, por su valioso apoyo y participación en el trabajo de laboratorio.

Tabasco A. C. and to the Administration of Regional Centers (Dirección de Centros Regionales), The Autonomous University of Chapingo for having financed this research. Thanks also to Mr. Cornelio Hernández García, for his assistance and participation in lab work.

End of english version

LITERATURA CITADA

1. Mendoza de GP, Zavaleta ME, Quiróz RH, Herrera RD, Perdomo RF. Interaction between the nematode-destroying fungus *Arthrobotrys robusta* (Hyphomycetales) and *Haemonchus contortus* infective larvae *in vitro*. Vet Parasitol 1992;41:101-107.
2. Borgsteede FHM. Gastrointestinal helminthiasis: Anthelmintic resistance and how to prevent and control. Symposium Parasitol Int 1998;47(Suppl):23-48.
3. Prichard R, Blackhall W, Lin H-Y, Sharma SR, Beech RN. Alterations in genetic variability of *Haemonchus contortus* (Nematoda) genes following selection with anthelmintics. Parasitol Int 1998;47(Suppl):105-131.
4. Sangster NC. Managing parasiticide resistance. Vet Parasitol 2001;98:89-109.
5. Waller PJ. Sustainable helminth control of ruminants in developing countries. Vet Parasitol 1997;(71):195-207.
6. Waller PJ. International approaches to the concept of integrated control of nematode parasites of livestock. Int J Parasitol 1999;(29):155-164.
7. Larsen M. Biological control in a global perspective – a review with emphasis on *Duddingtonia flagrans*. In: Biological Control of Nematode Parasites of Small Ruminants in Asia. 1st ed. Malaysia. FAO; 2002:19-37.
8. Larsen M. Biological control of helminths. Int J Parasitol 1999;(29):139-146.
9. Dijksteerhuis J, Veenhuis M, Harder W, . Nordbring-hertz B. Nematophagous Fungi: Physiological aspects and structure-function relationships. Adv Microb Physiol 1994;(36):11-139.
10. García, E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. 4ª ed. México, D. F. UNAM; 1988.
11. Llerandi JRD, Mendoza de GP. Resistance of chlamydospores of nematophagous fungi to the digestive processes of sheep in Mexico. J. Helminthol 1998;(72):155-158.
12. Flores CJ, Herrera RD, Vázquez PV, Martínez GJC, Mendoza de GP. Capacidad nematófaga de dos cepas del hongo *Duddingtonia flagrans* desarrollada en harina de maíz-agar. Vet Méx 1999;30(2):199-203.
13. Niec R. Cultivo e identificación de larvas infectantes de nematodos gastroentéricos del bovino y ovino. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Manual Técnico 3, 1ª ed. Argentina. 1968.
14. Tarazona VJM. Manual de técnicas de parasitología veterinaria. 1ª ed. Zaragoza, España. Editorial Acribia; 1973.
15. Mendoza de GP, Zavaleta ME, Herrera RD, Quiróz RH. *In vitro* trapping capability of *Arthrobotrys spp* on infective larvae of *Haemonchus contortus* and *Nacobbus aberrans*. J Helmintol 1994;(68):223-229.
16. Steel RG, Torrie JH. Bioestadistica: Principios y procedimientos. 2ª ed. México, D.F. Ed. McGraw-Hill; 1980.
17. SAS Institute. The SAS System for Windows. Version 8. SAS Institute. Inc. Cary, NC. USA. 1999.
18. Larsen M. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. Parasitol 2000;(120):121-131.
19. Mendoza de GP, Davies KD, Clark SJ, Behnke JM. Predatory behavior of trapping fungi against srf mutants of *Caenorhabditis elegans* and different plant and animal parasitic nematodes. Parasitol 1999;(119):95-104.
20. Gronvold J, Korsholm H, Wolstrup J, Nansen P, Henriksen SA. Laboratory experiments to evaluate the ability of *Arthrobotrys oligospora* to destroy infective larvae of Cooperia species and to investigate the effect of physical factors on the growth of the fungus. J Helminthol 1985;(59):119-125.
21. Nordbring-Hertz B. Ecology and recognition in the nematode-nematophagous fungus system. Adv Microb Ecol 1988;(10):81-114.
22. González CME, Mendoza de GP, Quiróz RH. Comparison of the trapping ability of *Arthrobotrys robusta* and *Monacrosporium gephyropagum* on infective larvae of *Strongyloides papillosus*. J Helminthol 1998;(72):209-213.
23. Fernández AS, Larsen M, Nansen P, Henningsen E, Gronvold J, Wolstrup J, Henriksen SA, Bjorn H. The ability of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* to reduce the transmission of infective *Ostertagia ostertagi* larvae from faeces to herbage. J Helminthol 1999(73):115-122.
24. Faedo M, Larsen M, Waller PJ. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: Comparison between Australian isolates of *Arthrobotrys spp* and *Duddingtonia flagrans*. Vet Parasitol 1997;(72):149-155.
25. Githigia SM, Thamsborg SM, Larsen M, Kyvsgaard NC, Nansen P. The preventive effect of the fungus *Duddingtonia flagrans* on trichostrongyle infections of lambs on pasture. Int J Parasitol 1997;8(27):931-939.